

MÉTABOLISME DE LA [4-¹⁴C]-TESTOSTÉRONE PAR LE TESTICULE EMBRYONNAIRE DE RAT CULTIVÉ *IN VITRO*

J.-P. WENIGER et A. ZEIS

Laboratoire de Zoologie et d'Embryologie expérimentale, 12, rue de l'Université, 67-Strasbourg et Groupe de Laboratoires du C.N.R.S., Applications biologiques, rue du Loess, 67 Strasbourg-Cronenbourg, France

(Received 9 October 1971)

SUMMARY

Testes from 15½–20½ day old rat embryos were cultivated *in vitro* in the presence of [4-¹⁴C] testosterone. The following androgens were identified in the homogenate by thin-layer radiochromatography, derivative formation and recrystallization to constant specific activity: androstenedione, 5 α -androstenedione, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol, 5 α -dihydrotestosterone and androsterone. With the present data, there is no conclusive evidence of the physiological role of these metabolites.

INTRODUCTION

IL A ÉTÉ démontré chez plusieurs espèces de Mammifères que les testicules embryonnaires sécrétaient de la testostérone [1–5]. On sait aussi que la testostérone représente l'agent responsable de la différenciation sexuelle de l'appareil génital mâle [6–12]. La question est encore discutée de savoir si elle agit par elle-même ou par l'intermédiaire de ses métabolites, mais toujours est-il qu'au cours de son utilisation par les canaux de Wolff, par exemple, elle est transformée principalement en 5 α -dihydrotestostérone [13]. On pouvait se demander si les testicules eux-mêmes l'utilisaient et chercher à identifier les métabolites formés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les testicules d'embryons de Rat Wistar ont été cultivés *in vitro* sur milieux gélosés [14], à 36,7–37,3°C, pendant 24 h, en présence de [4-¹⁴C]-testostérone (C.E.A., Gif-sur-Yvette).

La [4-¹⁴C]-testostérone a été livrée en solution dans le benzène. Après évaporation de celui-ci, elle a été dissoute dans le mélange propylène-glycol-Tyrode 1:3 (7,5 et 1,25 μ Ci/ml) et une gouttelette de 0,02 ml de cette solution a été déposée à la surface de chaque milieu de culture après l'explantation des testicules.

D'après le fabricant, la pureté radiochimique de la testostérone était de 97–98%: nous l'avons vérifié par radiochromatographie sur couche mince de gel de silice Merck F 254 dans le système chloroforme-acétone 9:1. Cette même vérification a été refaite à la fin de l'expérience, 20 jours plus tard, sans qu'aucune altération ait pu être décelée.

La culture terminée, les testicules ont été rincés à 3 reprises avec 1 ml de liquide de Tyrode, puis conservés dans du Tyrode frais, au congélateur à –20°C. Préalablement à l'extraction, ils ont été homogénéisés à froid à l'aide d'un homogénéiseur Polytron (Kinematica, Lucerne). L'homogénat est ensuite additionné de 50 μ g de chacun des 7 entraîneurs suivants: testostérone, androstènedione, 5 α -dihydrotestostérone, androsterone, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol, 5 α -andros-

tane-3 β ,17 β -diol et 5 α -androstanedione, puis extrait par le mélange éther-dichlorométhane 2:1 v/v. L'extrait est séché au moyen de sulfate de Na, puis, après réduction de son volume par évaporation dans un courant d'azote, au bain-marie à 45°C, chromatographié sur couche mince de gel de silice Merck GF 254 dans le système de solvants chloroforme-éther 7:3 v/v [15], en même temps que les 7 hormones de référence.

Celles-ci se séparent sous forme de 5 bandes, correspondant, par ordre de polarité décroissante, aux deux diols, à la testostérone, à la dihydrotestostérone et l'androstérone, à l'androstènedione et à l'androstanedione. Les deux diols se séparent ensuite par une nouvelle chromatographie sur couche mince de gel de silice Merck F 254 dans le système chloroforme-éther 9:1 v/v (4 développements) et la dihydrotestostérone et l'androstérone, après acétylation, dans le cyclohexane-acétate d'éthyle 9:1 v/v (3 développements). Un lecteur de radiochromatogrammes Berthold enregistre la répartition de la radioactivité le long des différentes couches minces. L'intégration des pics permet d'évaluer l'importance des différents métabolites.

Recristallisations à activité spécifique constante. Les recristallisations ont été faites dans tous les cas après addition de 20 mg du composé non radioactif. Après séchage à l'étuve à 50°C, pendant 2 h au moins, les cristaux, d'une masse voisine du mg, sont pesés à l'aide d'une balance Cahn à 0.02 mg près, puis dissous dans 15 ml de scintillateur (4 g Omnifluor - 11 toluène p.a. Merck). Les comptages de la radioactivité se font à l'aide d'un spectromètre Nuclear-Chicago Mark I et durent le temps qu'il faut pour réduire l'incertitude au seuil de 95% (double de l'écart-type) à moins de 2 ou 3%, suivant les cas. Les eaux-mères n'ont pas toujours pu être recueillies en quantité suffisante; si l'incertitude relative sur la masse dépasse à elle seule 4%, leur comptage a été omis. Seules ont été retenues les valeurs de l'activité spécifique dont l'incertitude relative (somme des incertitudes relatives sur le taux de comptage et la masse) est inférieure à 5%. L'activité spécifique est considérée comme constante et par conséquent le composé en question identifié, si les valeurs obtenues pour les 3 derniers échantillons de cristaux au moins ne diffèrent pas de plus de 5% de la valeur moyenne [16].

RÉSULTATS

Deux expériences ont été effectuées dans les conditions que résume le Tableau 1. Décrivons l'expérience 1 en détail.

La Figure 1 représente le radiochromatogramme de l'extrait total. Il présente 6 pics de radioactivité, dont les 5 premiers recouvrent respectivement les zones où ont migré les deux diols (I), la testostérone (II), la dihydrotestostérone et l'androstérone (III), l'androstènedione (IV) et l'androstanedione (V); la nature du pic VI est inconnue. A supposer qu'aucun des stéroïdes radioactifs n'ait été extrait préférentiellement, à supposer que le triple rinçage au Tyrode ait débarrassé les

Tableau 1. Conditions de culture des testicules embryonnaires de Rat

	Nombre de testicules	Âge	Nombre de milieux	Activité totale
Expérience 1	108	15 j. $\frac{1}{2}$ -20 j. $\frac{1}{2}$	9	1.35 μ Ci
Expérience 2	184	17 j. $\frac{1}{2}$	11	0.275 μ Ci

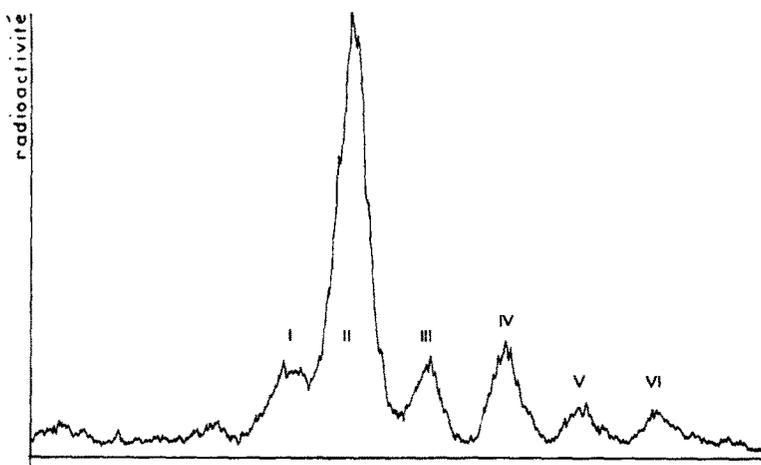


Fig. 1. Radiochromatogramme de l'extrait total de l'homogénat de l'expérience 1. Les pics I-V correspondent respectivement aux deux diols (I), à la testostérone (II), à la dihydrotestostérone et l'androstérone (III), à l'androstènedione (IV) et à l'androstanediol (V); la nature du pic VI est inconnue. Les pics I-VI représentent respectivement 12, 52, 10, 12, 8 et 6% de la radioactivité totale. Système de solvants: chloroforme-éther 7:3.

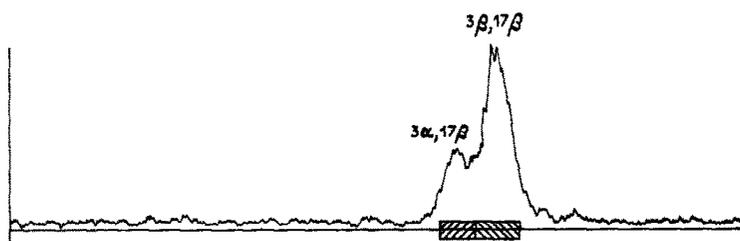


Fig. 2. Séparation du 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol et de son épimère 3 β . Les rectangles hachurés indiquent l'emplacement des entraîneurs: un pic correspond à chacun d'eux. Solvant: chloroforme-éther 9:1 v/v (4 développements).

testicules de toute trace de stéroïde radioactif se trouvant dans le milieu et sous réserve qu'aucun autre stéroïde ne contribue à la radioactivité du pic II, près de 50% de la testostérone absorbée ont été métabolisés. Les pics I, III, IV, V et VI représentent respectivement 12, 10, 12, 8 et 6% de la radioactivité totale.

La Figure 2 illustre la séparation des deux diols: un pic correspond à chacun des deux. Après acétylation, un pic est associé à chaque acétate, mais les recristallisations montrent que l'activité n'était pas liée à l'acétate de 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol. L'épimère 3 α , par contre, a pu être identifié (Tableau 2).

La Figure 3 illustre la séparation de l'androstérone et de la dihydrotestostérone après acétylation: un pic correspond à chacun des deux acétates, qui ont ensuite pu être recristallisés à activité spécifique constante (Tableau 2).

Après réduction de l'androstènedione, le radiochromatogramme ne présentait qu'un pic unique, mais qui ne se superposait pas exactement à la testostérone obtenue. Après acétylation, l'activité se divisa en quatre; celle correspondant à l'acétate de testostérone lui appartenait en propre, comme le montrent les résultats des recristallisations (Tableau 2).

L'androstanediol a été recristallisé directement: la constance de l'activité spécifique a été obtenue (Tableau 2).

Tableau 2. Identification des métabolites de la [4-¹⁴C]-testostérone par recrystallisations à activité spécifique constante. Valeurs de l'activité spécifique (en coups/mn/mg) ± incertitude au seuil de 95%

	Acétate 3 α , 17 β	Acétate 3 β , 17 β	Acétate DHT	Acétate Aér.	A (acétate T)	A'
Cr. 1	161 ± 6,3	34,5	183 ± 8,6	114	19,8 ± 0,9	63,6 ± 3,0
E.M. 1		501	136	140	14,2	75,5
Cr. 2	156 ± 6,7	28,5	191 ± 7,8	99	19,4 ± 0,9	62,0 ± 2,2
E.M. 2	159 ± 5,6	168	171	481	20,6 ± 1,0	63,2
Cr. 3	154 ± 6,3	14,3	191 ± 7,6	94,5 ± 3,1	19,5 ± 1,0	59,3 ± 2,3
E.M. 3	160 ± 5,1	109	167	126	—	76,3
Cr. 4	153 ± 6,4	8,8	186 ± 6,2	90,0 ± 3,0	19,3 ± 0,9	59,4 ± 2,4
E.M. 4	—	35,6	—	95,0 ± 2,2	—	62,3 ± 2,4
Cr. 5	156 ± 6,4	—	—	91,8 ± 4,1	—	61,0 ± 2,4
E.M. 5	—	—	—	91,7 ± 2,7	—	61,6 ± 2,5

Cr.: cristaux; E.M.: eaux-mères.

3 α ,17 β : 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol; 3 β ,17 β : 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol; DHT: 5 α -dihydrotestostérone; Aér.: androstérone; A: androsténone; A': 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol; T: testostérone.

Le bruit de fond était compris entre 28 et 29 coups/mn. Le rendement du compteur était de 80%.

Les recrystallisations ont été faites dans le dichlorométhane-éther de pétrole.

Les valeurs encadrées répondent au critère de constance adopté, c'est-à-dire qu'elles s'écartent de moins de 5% de la valeur moyenne.

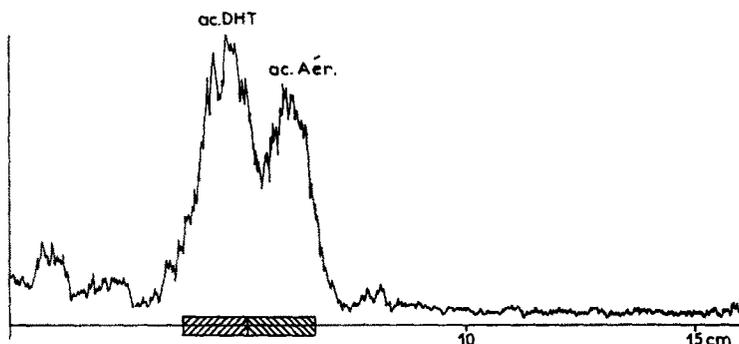


Fig. 3. Séparation des acétates de dihydrotestostérone et d'androstérone. Solvant: cyclohexane-acétate d'éthyle 9:1 (3 développements).

Les résultats de l'expérience 2 ont été en tous points semblables à ceux de l'expérience 1.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Nous nous étions proposé d'identifier les métabolites de la [4-¹⁴C]-testostérone dans le testicule embryonnaire de Rat cultivé *in vitro*. Sur les 6 androgènes recherchés, cinq ont pu être identifiés, à savoir l'androstènedione, la 5 α -androstanedione, le 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol, la 5 α -dihydrotestostérone et l'androstérone.

On peut naturellement se demander si ces métabolites sont formés *in vivo*. Dans nos expériences de culture *in vitro*, le testicule baignait dans un milieu riche en testostérone, qu'il absorbait et pouvait transformer à loisir. *In vivo*, par contre, à peine formée, la testostérone passe dans le sang et les transformations n'ont peut-être pas le temps de s'effectuer aussi facilement.

On peut encore se poser d'autres questions. Où s'effectuent les transformations, dans les cellules de Leydig ou les cordons sexuels? L'un ou l'autre métabolite intervient-il spécifiquement dans la phase de multiplication des gonocytes? Mais ces questions demeurent pour le moment sans réponse.

Terminons en signalant le travail de Steinberger *et al.*[17] sur le métabolisme de la [4-¹⁴C] testostérone par des cultures de cellules de Leydig de jeunes Rats de 20 jours. Les métabolites identifiés furent l'androstènedione et le 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol. Si, par rapport à notre propre travail, la gamme des métabolites paraît moins étendue, est-ce dû aux conditions de culture ou à la différence d'âge des testicules, les uns étant prélevés sur l'embryon, les autres sur le jeune Rat? Ou bien, les jeunes Rats, ayant été traités par la gonadotrophine chorionique humaine du 10^e au 20^e jour, celle-ci serait-elle responsable de ce rétrécissement du métabolisme? Quoi qu'il en soit, le résultat intéressant de notre travail semble bien être la formation de dihydrotestostérone.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rice B. F., Johanson C. A. et Sternberg W. H.: *Steroids* 7 (1966) 79.
2. MacArthur E., Short R. V. et O'Donnell V. J.: *J. Endocrin.* 38 (1967) 331.
3. Weniger J.-P., Ehrhardt J.-D. et Fritig B.: *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 264 (1967) Série D, 1069.
4. Weniger J.-P., Ehrhardt J.-D. et Fritig B.: *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 264 (1967) Série D, 1971.
5. Attal J.: *Endocrinology* 85 (1969) 280.
6. Wells L. J.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 63 (1946) 417.
7. Wells L. J.: *Arch. Anat. micr. Morph. exp.* 39 (1950) 499.

8. Jost A.: *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **140** (1946) 938.
9. Jost A.: *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **141** (1947) 126.
10. Jost A.: *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **141** (1947) 275.
11. Jost A.: *Arch. Anat. micr. Morph. exp.* **36** (1946-1947) 271.
12. Jost A.: *Arch. Anat. micr. Morph. exp.* **39** (1950) 577.
13. Weniger J.-P. et Zeis A.: *Acta endocr. (Kbh.)*.
14. Wolff Et. et Haffen K.: *J. exp. Zool.* **119** (1952) 381.
15. Morfin R. F., Aliapoulios M. A., Chamberlain J. et Ofner P.: *Endocrinology* **87** (1970) 394.
16. Axelrod L. R., Matthijssen C., Goldzieher J. W. et Pulliam J. E.: *Acta endocr. (Kbh.) Suppl.* 99 (1965).
17. Steinberger E., Steinberger A. et Ficher M.: *Recent Progr. Horm. Res.* **26** (1970) 547.